

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平10-17597

(43) 公開日 平成10年(1998) 1月20日

(51) Int. Cl. <sup>6</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 0 7 K 14/805			C 0 7 K 14/805	
A 6 1 K 35/14			A 6 1 K 35/14	Z
C 0 7 K 1/22			C 0 7 K 1/22	
G 0 1 N 33/72			G 0 1 N 33/72	A
// A 6 1 K 9/14			A 6 1 K 47/26	J
審査請求 未請求 請求項の数 2 F D (全 8 頁) 最終頁に続く				

(21) 出願番号 特願平8-188138

(22) 出願日 平成8年(1996) 6月27日

(71) 出願人 591083336

株式会社ビー・エム・エル

東京都渋谷区千駄ヶ谷5丁目21番3号

(72) 発明者 川野 吉郎

埼玉県川越市の場1361番地1 株式会社ビ

ー・エム・エル総合研究所内

(72) 発明者 工藤 康之

埼玉県川越市の場1361番地1 株式会社ビ

ー・エム・エル総合研究所内

(72) 発明者 坪井 五三美

埼玉県川越市の場1361番地1 株式会社ビ

ー・エム・エル総合研究所内

(74) 代理人 弁理士 志村 光春

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヘモグロビンA1c組成物

(57) 【要約】

【課題】長期間安定で、かつ新鮮血液のHPLCクロマトグラムパターンを示す糖尿病診断等において極めて有用なHbA<sub>1c</sub>組成物の提供。

【解決手段】ヘモグロビンA<sub>1c</sub>及びサッカロースを含んでなるヘモグロビンA<sub>1c</sub>組成物、特にヘモグロビンA<sub>1c</sub>が、血液試料をm-アミノフェニルボロン酸をリガンドとして固定したアフィニティクロマトグラム担体で捕捉して得られるヘモグロビンA<sub>1c</sub>であるこのヘモグロビンA<sub>1c</sub>組成物を提供すること。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】ヘモグロビンA<sub>1c</sub>及びサッカロースを含んでなるヘモグロビンA<sub>1c</sub>組成物。

【請求項2】ヘモグロビンA<sub>1c</sub>が、血液試料をm-アミノフェニルボロン酸をリガンドとして固定したアフィニティクロマトグラム担体で捕捉して得られるヘモグロビンA<sub>1c</sub>である請求項1記載のヘモグロビンA<sub>1c</sub>組成物。

## 【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、ヘモグロビンA<sub>1c</sub>の凍結乾燥復元後の保存性を格段に向上させたヘモグロビンA<sub>1c</sub>組成物に関する技術分野に属する。

【0002】

【従来の技術】血液中のヘモグロビンは、 $\alpha$ 鎖N末端のアミノ酸のバリンのアミノ基とグルコースのアルデヒド基の間の非酵素的な反応によりグルコースと結合する。この結合の第一段階は、可逆的なシッフ塩基反応であるが、さらにアマドリ転移反応を経て不可逆的なケトアミンを形成する。このようにして生成するヘモグロビンとグルコースの結合物は、ヘモグロビンA<sub>1c</sub>（以下、HbA<sub>1c</sub>ともいう）として知られている。ヘモグロビンの血液中での寿命は約3ヵ月であり、その間グルコースと結合して生成するHbA<sub>1c</sub>が徐々に蓄積するが、その一方で寿命が尽きたHbA<sub>1c</sub>は逐次分解されていく。すなわち、ある時点で血液中に存在しているHbA<sub>1c</sub>の濃度は、その時点からヘモグロビンの寿命のおよそ半分の1～2ヵ月程遡った過去の血液中のグルコース濃度、すなわち血糖濃度を平均的に反映するものである。

【0003】このような特徴を有するHbA<sub>1c</sub>は、一般的な糖尿病の指標である血糖濃度等のように一時的な変動が無く過去の血糖状態を正確に把握できる。そのため、血中のHbA<sub>1c</sub>濃度は糖尿病患者の血糖コントロール指標として、今日重要である。HbA<sub>1c</sub>の定量法には、イオン交換カラムを使用した高速液体クロマトグラフィー（以下、HPLCという）、m-アミノフェニルボロン酸をリガンドとして固定したアフィニティクロマトグラム担体を用いたアフィニティークラム法、ラテックス凝集法、免疫比濁法、等電点電気泳動法、フィチン酸法、チオバルビツール酸法等があるが、感度、特異性、再現性に優れており、また専用の簡便な自動分析機が普及したこともあって、HPLC法が臨床検査においては標準的な測定法となっている。

【0004】ここで問題となるのは、HbA<sub>1c</sub>測定における標準としたり、また測定機器や施設間、あるいはデータの継続性等の精度管理の基準として使用する「管理試料」を得ることである。HbA<sub>1c</sub>管理試料の製造方法についてはいくつかの検討例がある。例えば、赤血球の溶血液に保存料を添加して製造する方法（東独特許第150543号、米国特許第3519572号、英国特許第934461号）、シアンメトヘモグロビン、オキシ

ヘモグロビン-ポリヒドロキシ化合物、一酸化炭素ヘモグロビンを用いて製造する方法〔ドイツ特許第3311458号、ヨーロッパ特許第72440号、"Mosca. A., et al., J.Clin.Chem. Clin. Biochem.23:361-364(1985)"〕、N-〔5-ニトロトロポニン-2-イル〕ヘモグロビンとヘモグロビンとの混合物からなるもの（特公昭63-19828号公報）、ポリヒドロキシ化合物により全血から得られる溶血液を脱脂する方法（特開昭58-37561号公報）、シアンメトヘモグロビンに変換し凍結乾燥する方法（特開昭59-183370号公報）、HbA<sub>1c</sub>の代用としてアセチル化ヘモグロビンより製造する方法（特開平3-220457号公報）、ヘモグロビンを一酸化炭素ヘモグロビン、アザイドメトヘモグロビン又はシアンメトヘモグロビンに変換した状態でインビトロでグルコースとヘモグロビンを結合させた後、不安定なシッフ塩基結合のものを還元剤により分解し、安定なHbA<sub>1c</sub>を回収して製造する方法（特表平6-508690号公報）等を挙げることができる。なお、現在Bio-Rad社の製品〔Bio-Rad Laboratories, Hemoglobin AlcMicro Column test Instruction Manual, March 1990〕をはじめとして、いくつかの製品が市販されているが、これらの製品の製法は明らかにされていない。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】このHbA<sub>1c</sub>の管理試料においては、実際の検体である新鮮血液と分析時の挙動が同等であることが必要である。何故なら、ヘモグロビンは、時間、温度等の負荷によって、主に酸化による変性を起こし、酸化されたヘモグロビンであるメトヘモグロビンと、酸化していないヘモグロビンであるオキシヘモグロビンとは、その電荷が異なるからである。

【0006】HbA<sub>1c</sub>の主流である上記のイオン交換HPLC法は、HbA<sub>1c</sub>をその他のヘモグロビンとの電荷の差により分離するものであるが、上述のように酸化されたヘモグロビン（酸化されたHbA<sub>1c</sub>を含む）が混合すると、クロマトグラムの分離パターンが乱れ、非常に鋭敏なHPLCにおいては、新鮮血液本来のものとはかなり異なるものとなる。よって、HbA<sub>1c</sub>の管理試料としては、個々のロットが長期に継続することが要求される。また、この管理試料が凍結乾燥品の場合には、凍結乾燥時の安定性のみならず、使用時に精製水等を加え溶解し復元した後の安定性も要求される。

【0007】なお、このHbA<sub>1c</sub>の管理試料に要求される安定性を満たす従来の手段としては、例えば①始めから全成分をメトヘモグロビンとして、ヘモグロビンをそれ以上酸化変性する余地をなくし、全成分中での電荷の差を、HbA<sub>1c</sub>とその他のヘモグロビンとの間のものだけとし、HbA<sub>1c</sub>とその他のヘモグロビンとの分離を明確にする方法；②一酸化炭素と2価の状態のヘム鉄との結合が酸素のほぼ数万倍は強いことに着目し、全成分を

一酸化炭素ヘモグロビンとして、ヘム鉄が3価に変わるヘモグロビンの酸化を防ぐ方法【①②】に該当する先行技術文献としては、前出のドイツ特許第3311458号、ヨーロッパ特許第72440号、“Mosca.A., et al., J.Clin.Chem. Clin. Biochem.23:361-364(1985)”；特開昭59-183370号公報；特表平6-508690号公報】等を挙げることができる。

【0008】しかしながら、これらの方法における問題点として、全体がメトヘモグロビンの場合は、HPLC法の分離パターンが新鮮血液と同一であっても全体的にリテンションタイムが新鮮血液のリテンションタイムから外れるために、新鮮血液のための機器調整等に必ずしも適合するものではなく、メト化したHbA<sub>1c</sub>のリテンションタイムに基づき機器の調整をした場合、新鮮血液の本来のHbA<sub>1c</sub>のピークをHbA<sub>1c</sub>のものとして機器が識別することができないという点が挙げられる。また、新鮮血液のHbA<sub>1c</sub>のピークに異常が現れるようなHPLCのカラムの劣化等の異常がある場合に、メトヘモグロビンの管理試料ではこのような異常をモニターすることができないという点も挙げることができる

【①】。そして、一酸化炭素ヘモグロビンを用いる場合においても、次の製造工程において、グルコースと反応させるために加温したりした場合には、完全に変性を防ぐことはできない【②】。

【0009】さらに、上記に例示した方法の他に、電荷がHbA<sub>1c</sub>と等しく、HPLC法において、HbA<sub>1c</sub>と同じ位置にピークを示すため、HbA<sub>1c</sub>の代用としてアセチル化ヘモグロビンを用いる方法も挙げられるが、この場合のHPLCのクロマトグラムのパターンもまたHbA<sub>1c</sub>と同一とはいえない。すなわち、これらの従来のいずれの方法によって製造されたHbA<sub>1c</sub>管理試料も、HbA<sub>1c</sub>測定の主流である上記のHPLC法に適しているとはいえない。

【0010】そこで、本発明の解決すべき課題は、長期間安定で、かつ新鮮血液のHPLCクロマトグラムパターンを示す糖尿病診断等において極めて有用なHbA<sub>1c</sub>の試料を提供する手段を見出すことにある。

【0011】

【課題を解決するための手段】本発明者は、上記課題の解決に向けて鋭意検討を行った。その結果、通常検体の安定剤としてサッカロースをHbA<sub>1c</sub>と共存させることにより、HbA<sub>1c</sub>の安定性、特に凍結乾燥復元後の保存性を格段に向上させることができることを見出し本発明を完成した。

【0012】また、このサッカロースと共存させる、糖尿病診断に特に有用なHbA<sub>1c</sub>の調製方法として、m-アミノフェニルボロン酸をリガンドとして固定したアフィニティクロマトグラム担体を用いた特定の手段を用いることで、極めて優れたHbA<sub>1c</sub>の管理試料を提供し得ることを見出して本発明を完成した。すなわち

本発明者は、以下の発明を提供する。

【0013】請求項1において、ヘモグロビンA<sub>1c</sub>及びサッカロースを含んでなるヘモグロビンA<sub>1c</sub>組成物を提供する。

【0014】請求項2において、ヘモグロビンA<sub>1c</sub>が、血液試料をm-アミノフェニルボロン酸をリガンドとして固定したアフィニティクロマトグラム担体で捕捉して得られるヘモグロビンA<sub>1c</sub>である前記請求項1記載のヘモグロビンA<sub>1c</sub>組成物を提供する。

【0015】

【発明の実施の形態】以下、本発明の実施の形態について説明する。

A. 本発明ヘモグロビンA<sub>1c</sub>組成物（以下、本発明組成物ともいう）は、HbA<sub>1c</sub>とサッカロースとを含んでなる。本発明組成物中におけるHbA<sub>1c</sub>の形態は、特に限定されない。すなわち、新鮮血中のHbA<sub>1c</sub>をそのまま用いることもできるし、上記のように、メトヘモグロビンとグルコースとが結合したHbA<sub>1c</sub>等も許容され、一酸化炭素結合ヘモグロビンとグルコースとが結合したHbA<sub>1c</sub>も許容され、HbA<sub>1c</sub>の代用物質、例えばアセチル化ヘモグロビン等も許容される。

【0016】しかしながら、可能な限り生体内のHbA<sub>1c</sub>の状態を反映させたHPLCクロマトグラムを得ることが検査の信頼性を向上させる上で好ましいことを考慮すると、新鮮血中のHbA<sub>1c</sub>をそのまま用いることが好ましい。

【0017】そして、この新鮮血中のHbA<sub>1c</sub>を得る手段は特に限定されるものではなく、公知のHbA<sub>1c</sub>の入手段を用いることができる。すなわち、血液試料をm-アミノフェニルボロン酸をリガンドとして固定したアフィニティクロマトグラム担体で捕捉して得る方法；イオン交換カラムで分離して得る方法；電気泳動で分離して得る方法等を挙げることができる。

【0018】これらのHbA<sub>1c</sub>の入手段のうちでも、特に前述したHbA<sub>1c</sub>の管理試料を得る場合には、血液試料をm-アミノフェニルボロン酸をリガンドとして固定したアフィニティクロマトグラム担体で捕捉して得る方法を選択することが好ましい。このHbA<sub>1c</sub>の調製方法については、後述する。

【0019】本発明組成物中に上記HbA<sub>1c</sub>と共に配合するサッカロースは、総ヘモグロビン1重量部に対して0.3重量部以上、同10重量部以下の範囲で配合される。総ヘモグロビン1重量部に対して0.3重量部未満では所望するHbA<sub>1c</sub>の安定効果が十分に発揮されずに好ましくなく、同10重量部を越えて配合すると凍結乾燥の際、余剰のサッカロースに対する結合水が気化せずバイアルに水分が残留し、好ましくない。

【0020】また、好適なサッカロースの配合量は、総ヘモグロビンの濃度によって異なる。具体的には、総ヘモグロビン濃度が通常の検体程度、すなわち10～15

g/dl 程度のものには、総ヘモグロビン 1 重量部に対して 1 重量部程度が適当であり、総ヘモグロビン濃度がさらに希薄な場合、すなわち 1.0 g/dl 程度のものには、総ヘモグロビン 1 重量部に対して 5 重量部程度が適当である。

【0021】このように、HbA<sub>1c</sub> とサッカロースを組み合わせて配合することにより、HbA<sub>1c</sub> の安定性、特に凍結乾燥後の HbA<sub>1c</sub> の安定性を飛躍的に向上させることができる。

【0022】なお、本発明組成物中には、上記必須成分の他に、ヘモグロビンの酸化防止等を目的として、本発明の所期の効果を損なわない範囲で他の任意成分を配合することが可能である。例えば、アスコルビン酸、三リン酸塩、カテキン、亜硫酸ナトリウム、亜硫酸水素ナトリウム、硫酸第一鉄、グルタチオン等を本発明組成物中に配合することができる。

【0023】なお、本発明組成物の所期の経時的安定効果を発揮させる最も好適な形態は、凍結乾燥品としての形態であるが、この凍結乾燥品の調製に際しては通常公知の方法を採用することができる。

【0024】例えば、-30℃~-40℃で試料を凍結し、減圧し、棚温-20℃~4℃で5~100時間程度乾燥することにより所望する凍結乾燥製剤を得ることができる。なお、本発明においては、特に本発明組成物中のサッカロースを乾燥させるために、90~100時間程度乾燥させることが好ましい。

【0025】このように調製した本発明組成物は、格段に経時的な安定性に優れており、後述するごとく HbA<sub>1c</sub> の管理試料として特に優れた組成物である。また、その特性を生かして、本発明は HbA<sub>1c</sub> の検出を目的とする検体試料にも適用することができる。すなわち、HbA<sub>1c</sub> の検出を目的とする後述する溶血処理を施した血液検体に、上記の配合割合でサッカロースを添加することによって、従来の HbA<sub>1c</sub> の検出を目的とする血液検体よりも保存性が格段に向上した本発明組成物としての血液検体を得ることができる。なお、この本発明組成物としての血液検体は、上記の管理試料と同様の凍結乾燥品としての形態を採用することも可能であるが、凍結乾燥処理を省略した液状形態や乾燥処理を省略した凍結形態としての形態を採用することも可能である。

【0026】B. 本発明組成物を構成する HbA<sub>1c</sub> の最も好ましい調製方法は、血液試料を m-アミノフェニルボロン酸をリガンドとして固定したアフィニティークロマトグラム担体で捕捉して得る方法である。特に、HbA<sub>1c</sub> の管理試料の製造を前提とする場合には、この手段を選択することが特に有効である。

【0027】これは、以下に掲げる理由による。

①従来の HbA<sub>1c</sub> の管理試料は、一般的にそのレベル調製の際に問題がある。特に、高い HbA<sub>1c</sub> レベルを得る必要がある場合に問題がある。すなわち、HbA<sub>1c</sub> の

レベルの正常値は、ヘモグロビン全量に対して 4.0~5.8 重量% 程度であるが、糖尿病の発病に伴い生体の血糖コントロールが悪化するとこれより高値となり、同 10 重量% を越える場合もある。これに対応して臨床検査用の HbA<sub>1c</sub> の管理試料としてのふさわしいレベルとしては、低値用でヘモグロビン全量に対して 4.0~5.0 重量% 程度であり、高値用としては、同 10~15 重量% 程度である。

【0028】どのような手段を採るにしても、HbA<sub>1c</sub> の原材料は、人血をはじめとする哺乳動物の新鮮血なのであるから、新鮮血中のある程度の HbA<sub>1c</sub> 量のばらつきは避けることができない。特に、高値用の管理試料を製造する場合には HbA<sub>1c</sub> 量が高値である糖尿病患者の血液を用いる必要があり、この確保には非常な困難を伴うのが常である。また、インビトロでヘモグロビンとグルコースを人為的に結合させるためには、時間とある程度の温度が必要になり、前述のようなヘモグロビンの変性を伴うことは避けがたいことである。

【0029】この点において、上記の担体捕捉法を用いることにより、健康人の新鮮血を原材料として、ヘモグロビンを変性させずに HbA<sub>1c</sub> を高値に加工することが容易である。

【0030】②検体のヘモグロビン濃度に応じた管理試料が必要である。すなわち、HbA<sub>1c</sub> 量の測定においては、検体として全血又は沈降赤血球を用い、ここから得られるヘモグロビン溶液の全ヘモグロビン中における HbA<sub>1c</sub> の相対量 (%) として測定される。この検体は通常全ヘモグロビン濃度を希釈するが、この希釈倍率がそれぞれの測定法毎に大きく異なる。従って、HbA<sub>1c</sub> の管理試料は、相対的に HbA<sub>1c</sub> が高濃度で存在しても低濃度で存在しても、少なくともあらゆる測定法に対応できるだけの濃度、具体的には 1.0 g/dl 以上の濃度であることが理想的である。

【0031】上記の担体捕捉法は、HbA<sub>1c</sub> の高値成分の分画を得る場合も低値成分の分画を得る場合にも、アフィニティークラムが HbA<sub>1c</sub> を特異的に吸着する。そのために、HbA<sub>1c</sub> とそれ以外のヘモグロビンとを両者の溶出速度の差を用いて分離する必要がなく、単に HbA<sub>1c</sub> 以外のヘモグロビンを溶出液で押し出すことのみにより両者を分離することができる。すなわち、上記の担体捕捉法においては、イオン交換樹脂等による分離の場合に比べて、HbA<sub>1c</sub> とそれ以外のヘモグロビンとを分離する際に用いる溶出液量を格段に節約することが可能になるため、結果として HbA<sub>1c</sub> の高値成分の分画を得る場合も低値成分の分画を得る場合にも、試料における総ヘモグロビン濃度を 1.0 g/dl 以上の濃度とすることができる。

【0032】上記の担体捕捉法において用いる血液試料は、通常溶血試料を用いる。この溶血試料の調製工程は、常法に従い行われる。すなわち、採取した新鮮血液

から分離した赤血球の細胞膜を破壊することにより行うことができる。この破壊手段は、例えば激しく振盪して細胞膜を破壊する振盪法、超音波で細胞膜を破壊する超音波法、低張溶液中で細胞膜を破壊する浸透圧法、界面活性剤で膜を溶解する方法等通常公知の破壊手段を用いることが可能である。通常この溶血を行った後、破断した赤血球膜脂質等を脱脂処理等の手段により除去する。

【0033】なお、この赤血球の細胞膜の破壊に先立ち、予め赤血球を十分に洗浄して遊離のグルコースを除去し、Labile HbA<sub>1c</sub>（シッフ塩基結合の段階のグルコースとヘモグロビンとの結合物、可逆性がある）を分解しておくことが好ましい。このようにして、通常は10g/dl以上のヘモグロビン濃度の精製溶血液を得ることができる。

【0034】次に、上記血液試料（精製溶血液）をm-アミノフェニルボロン酸をリガンドとして固定したアフィニティクロマトグラム担体に捕捉処理を行い、この担体に捕捉されたHbA<sub>1c</sub>を選択的に分離する。m-アミノフェニルボロン酸は、シスジオール基と結合する性質を有するために、このm-アミノフェニルボロン酸をアガロースやポリアクリルアミド等の担体にリガンドとして固定したアフィニティクロマトグラフィーにかけることにより、全ヘモグロビンの中から、シスジオール基を有するグルコースと結合しているHbA<sub>1c</sub>を選択的に捕捉して分離することができる。

【0035】上記のm-アミノフェニルボロン酸を担体に固定するためのスペーサーは、通常公知のものを用いることが可能であり、例えばNH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>COOH等をスペーサーとして用いることができる。なお、このようなスペーサーを用いずに活性化したアガロースにm-アミノフェニルボロン酸を結合させることも可能である。

【0036】また、m-アミノフェニルボロン酸は、HbA<sub>1c</sub>を特異的に捕捉することができるリガンドとして最も好ましいものであるが、その他の（オルト）ほう酸基を有する物質や抗HbA<sub>1c</sub>抗体等のHbA<sub>1c</sub>を特異的に吸着することができる物質をリガンドとすることができる。

【0037】このm-アミノフェニルボロン酸をリガンドとして固定した担体は、通常公知の方法を組み合わせることも可能であるが、市販品を用いることも可能である。例えばシグマ社からm-アミノフェニルボロン酸をリガンドとして固定した担体が市販されている。

【0038】さらに、コンディショニングしたm-アミノフェニルボロン酸をリガンドとして固定した担体に、上記血液試料を仕込み、この担体を選択的に捕捉されたHbA<sub>1c</sub>を個別的に溶出させて分離することができる。

【0039】この工程では、先ず担体に吸着するHbA<sub>1c</sub>が変性しない条件（2～8℃程度の低温及び遮光条件

下）で、十分な時間をかけて血液試料中のHbA<sub>1c</sub>を担体に吸着させる。このような条件で、選択的に担体に吸着させたHbA<sub>1c</sub>を溶出させて所望するHbA<sub>1c</sub>を得ることができる。

【0040】この溶出の際の溶出液は、通常HbA<sub>1c</sub>と同じくシスジオール基を有する成分、例えばソルビトール等を含むものを用いる。なお、上記のHbA<sub>1c</sub>の選択的な吸着-溶出工程において、血液試料をm-アミノフェニルボロン酸をリガンドとして固定した担体に仕込む際に、過剰量の血液試料を仕込むことで、所望する濃度でHbA<sub>1c</sub>を含む管理試料を容易に調製することができる。

【0041】すなわち、過剰の血液試料を仕込んで、ゲルベットの部分に残っている血液試料を低値用管理試料と高値用管理試料とに分別して、原料ヒト健常者血液のままのHbA<sub>1c</sub>濃度の精製溶血液と両者の試料とを任意の比率で混合することにより所望するHbA<sub>1c</sub>濃度の管理試料を調製することができる。

【0042】低値用管理試料については、例えばゲルベットの部分に残っているが担体に吸着されていない血液試料を、HbA<sub>1c</sub>と担体との吸着状態を保持できる溶液で溶出させて、これを低値用管理試料として用いることができる（この血液試料は、血液試料中に存在する本来の濃度のHbA<sub>1c</sub>の一部分が担体に吸着されているので、HbA<sub>1c</sub>の存在量が血液試料本来のものよりも低濃度となる。）。また、高値用管理試料は、例えば前記のように担体を選択的に吸着されたHbA<sub>1c</sub>を溶出させることにより得ることができる。

【0043】なお、このようにして得たHbA<sub>1c</sub>が高値と低値の溶液を透析にかけることにより、前記したHbA<sub>1c</sub>の安定剤であるサッカロースを添加して試料を凍結乾燥にかける際の水分の蒸発を妨げるマグネシウムイオンやソルビトール等の成分を除去することが好ましい。

（なお、この透析における希釈を考慮して、透析試料をさらに濃縮することが好ましい）。

【0044】

【実施例】以下、本発明を実施例等によりさらに具体的に説明するが、本発明の技術的範囲がこの実施例等により限定されるものではない。

【0045】〔製造例〕本発明組成物の製造

（1）溶血液の調製

450mlの健常人のヒト全血を、50ml容遠心管に約45mlずつ分注し、遠心分離器（1250×g, 5min, 4℃）にかけ、上清の血漿、血小板、白血球を除去して赤血球を分離した。この分離した赤血球に3/2容量の生理食塩水を加えて混合し、これを再び遠心分離器（1250×g, 5min, 4℃）にかけ、生理食塩水を除去した。この生理食塩水による洗浄操作を8回繰り返した（8回目の遠心時間は10分間）。このようにして、洗浄赤血球200mlを調製した。得られた洗浄赤血球に等

量の氷冷した精製水を加え、激しく振盪して赤血球を溶血させて溶血液400mlを調製した。

【0046】次に、上記の溶血液に対して、1/4容量のトルエンを加えて激しく振盪し、遠心分離(1800×g, 30min, 4℃)にかけ、3層に分離したうちの下層部分を回収した。回収した画分を再び遠心分離(1800×g, 15min, 4℃)にかけ、上層に浮くか又は底に沈殿した不溶解物を除き、透明な部分のみを回収して、これを精製溶血液とした〔この精製溶血液のうち150mlを取り、安定剤(サッカロースの50重量%水溶液)を、16.7ml加え均一になるまで混合して、これを「原料血液そのままのHbA<sub>1c</sub>濃度の溶液」とした。】

#### 【0047】(2) ゲルの調製

内径50mmのカラムに、m-アミノフェニルポロン酸アガロースゲル(シグマ社製)を約250ml充填した。ゲル調整液として水酸化ナトリウム0.08重量%溶液を流速約50ml/minで約1000ml流した後、同じくゲル調整液として酢酸0.3重量%溶液を流速約50ml/minで約1250ml流した。次いで、精製水を流速約50ml/minで約2500ml流した。なお、このゲルの調整工程を通じて、カラムジャケットには循環ポンプで約20℃の冷却水を流した。

【0048】このようにして調整したゲルに、平衡化液[EPPS(0.505重量%), 水酸化ナトリウム(pH8.6とするための必要量), 塩化ナトリウム(0.877重量%), 塩化マグネシウム・6水塩(0.203重量%), 精製水(残量)]を流速約50ml/minで約2500ml流してゲルを平衡化した。なお、このゲルの平衡化工程を通じて、カラムジャケットには循環ポンプで約20℃の冷却水を流した。

#### 【0049】(3) HbA<sub>1c</sub>のゲル吸着

上記(2)において平衡化したゲルに上記(1)で調製した精製溶血液を3000ml混合し、垂直に立てたカラム内で2~8℃で遮光し、16~24時間静置した。次に、ゲルベットの上に溜まった精製溶血液を駒込ピペットでカラム上から排出した。なお、この排出工程を通じて、カラムジャケットには循環ポンプで約2~8℃の冷却水を流した。

#### 【0050】(4) HbA<sub>1c</sub>低値溶液の溶出

上記(2)と同一の組成の平衡化液を流速約50ml/minで1000ml流して、溶出した液をフラクションコレクターで試験管に約10mlずつ分画して回収した。なお、この溶出工程を通じて、カラムジャケットには循環ポンプで約2~8℃の冷却水を流した。0.5g/dlのヘモグロビン水溶液を用意し、これを対照として目視により、およそこの対照よりも濃い分画をビーカーにブールした。

#### 【0051】(5) HbA<sub>1c</sub>高値溶液の溶出

上記(4)に引続き、上記(2)と同一の組成の平衡化

液を流速約50ml/minで1500ml流した(この工程を通じて、カラムジャケットには循環ポンプで約2~8℃の冷却水を流した)。なお、この工程の間に溶出した液は廃棄した。

【0052】次に、分離液[EPPS(0.505重量%), 水酸化ナトリウム(pH8.6とするための必要量), D-ソルビトール(1.822重量%), 精製水(残量)]を流速約25ml/minで1500~2000ml流して、溶出した液をフラクションコレクターで試験管に約10mlずつ分画して回収した。なお、この溶出工程を通じて、カラムジャケットには循環ポンプで約2~8℃の冷却水を流した。0.5g/dlのヘモグロビン水溶液を用意し、これを対照として目視により、およそこの対照よりも特に濃い分画から約100mlまでブールした。

#### 【0053】(6) 透析及び濃縮

上記(4)(5)により得られたHbA<sub>1c</sub>低値溶液及び同高値溶液をそれぞれ透析チューブに詰め(低値溶液約180ml/チューブ、高値溶液約100ml/チューブ)、精製水にこの透析チューブを浸漬して、2~8℃で遮光し、約2時間スターラーで精製水を攪拌した〔低値溶液の精製水約20l、高値溶液の精製水約10l〕。この透析の終了後、精製水にこの透析チューブを浸漬して、2~8℃で遮光し、約16時間静置した〔低値溶液の精製水約20l、高値溶液の精製水約10l〕。

【0054】上記透析工程の終了したそれぞれの透析チューブを、約5lの濃縮剤〔ポリエチレングリコール2000の30重量%水溶液〕に浸漬し、2~8℃で遮光してスターラーで濃縮剤を攪拌した。HbA<sub>1c</sub>低値溶液の透析チューブは、約2時間後に上記濃縮剤から取り出し、表面に付着した濃縮剤を氷冷した精製水で洗い流した後、表面の水分をペーパータオルで拭き取り、透析チューブ中の液体をメスシリンダーに採取して、その液量を定量し、これに1/9容量の安定剤(サッカロースの50重量%水溶液)を加え、均一になるまで混合し、下記の濃度調整工程を経て後述の凍結乾燥工程に処した。

【0055】また、HbA<sub>1c</sub>高値溶液の透析チューブは、約4時間後に上記濃縮剤から取り出し、表面に付着した濃縮剤を氷冷した精製水で洗い流した後、表面の水分をペーパータオルで拭き取り、透析チューブ中の液体をメスシリンダーに採取して、その液量を定量し、これに1/9容量の上記安定剤を加え、均一になるまで混合し、下記の濃度調整工程を経て後述の凍結乾燥工程に処した。

#### 【0056】(7) HbA<sub>1c</sub>及び総ヘモグロビン量の濃度調整

前記(1)において調製した「原料血液そのままのHbA<sub>1c</sub>濃度の溶液」並びに前記(6)において調製した「HbA<sub>1c</sub>低値溶液」及び「HbA<sub>1c</sub>高値溶液」の総ヘモグロビン量をアザイドメトヘモグロビン法により定量

し、次にHbA<sub>1c</sub>濃度をHPLC法〔HLC-723HbIII型HbHbA<sub>1c</sub>自動分析機（東ソー社製）による〕により定量した。

【0057】次いで、「原料血液そのままのHbA<sub>1c</sub>濃度の溶液」と「HbA<sub>1c</sub>低値溶液」又は「HbA<sub>1c</sub>高値溶液」を混合して、それぞれ所望のHbA<sub>1c</sub>濃度に調整した上で、安定剤（サッカロースの5重量%水溶液）を加えて総ヘモグロビン濃度を1.0g/dlに合わせた。

【0058】（8）凍結乾燥

上記（7）で濃度調整した「HbA<sub>1c</sub>低値溶液」及び「HbA<sub>1c</sub>高値溶液」を10ml容褐色バイアルに2mlずつ分注し、これらのバイアルを凍結乾燥機に入れ、制御運転〔第1段階：-20℃・10時間、第2段階：-20℃・10時間、第3段階：-4℃・10時間、最終制御：4℃・60～70時間；到達真空度：約10mTorr〕を行い、凍結乾燥品を得た。凍結乾燥が終了したそれぞれのバイアルに窒素を充填し、封栓しアルミシールを施した。このように、HbA<sub>1c</sub>の管理試料としての本

第1表

安 定 剤	HbA <sub>1c</sub> [%] (HPLC法)	
	凍結乾燥前	凍結乾燥後
無 添 加	6.3	3.3Δ
D-キシロース 10重量%	6.3	14.8
D-アラビノース 10重量%	6.3	9.3
D-ソルビトール 10重量%	6.3	6.1
マルトース 10重量%	6.3	6.5Δ
サッカロース 10重量%	6.3	6.1

\*D-キシロース、D-アラビノースはアルドース系単糖類に分類される

\*Δは、HPLCでの分離異常を示す

【0062】この第1表において、糖類を添加しなかった試料は、凍結乾燥後は、この凍結乾燥操作自体によるヘモグロビンの変性が著しく、HPLC分析に耐えられないものとなった。また、アルドース系単糖類であるD-キシロース又はD-アラビノースを添加した群は、凍結乾燥操作によるヘモグロビンの変性は抑制されたが、凍結乾燥中の反応により凍結乾燥前後でHbA<sub>1c</sub>値が大きく異なるものとなった。

【0063】この結果より、HbA<sub>1c</sub>の凍結乾燥における安定性を付与するための安定剤としては、アルドース単糖類は不適当であることが明らかになった。なお、D-ガラクトース、D-マンニトール、ラクトースはヘモ

発明組成物を得た。

【0059】〔試験例〕本発明組成物の凍結乾燥前後における経時的安定性の検討

（1）本発明組成物においてHbA<sub>1c</sub>の安定剤として配合するサッカロースの凍結乾燥前後における経時的安定性を、他の糖類を配合した場合との比較において検討した。すなわち、予め凍結乾燥前の全ヘモグロビン量を10g/dlに調整した各試料における全ヘモグロビン量中のHbA<sub>1c</sub>量を上記製造例（7）で示したと同様の方法で測定した。

【0060】次に、これらの各試料を上記製造例（8）に示したと同様の方法で凍結乾燥した後、これらの凍結乾燥品に精製水0.5mlを加えて、各試料における全ヘモグロビン量中のHbA<sub>1c</sub>量を上記と同じく測定した。この結果を第1表に示す。

【0061】

〔表1〕

グロビン溶液における溶解度が低いのでこの試験系からは除外した。

【0064】（2）次に、この試験系で安定性に優れていたD-ソルビトール添加群とサッカロース添加群の凍結乾燥後における経時的安定性を検討した。すなわち、D-ソルビトール添加群とサッカロース添加群の凍結乾燥直後におけるHbA<sub>1c</sub>の安定性を、試料の凍結乾燥直後のHbA<sub>1c</sub>値と凍結乾燥後1ヵ月後（室温）のHbA<sub>1c</sub>値をHPLC法により比較した。この結果を第2表に示す。

【0065】

〔表2〕

第 2 表

安 定 剤	HbA <sub>1c</sub> (%) (HPLC法)	
	凍結乾燥直後	凍結乾燥後1ヵ月
D-ソルビトール 10重量%	10.5	9.4
D-ソルビトール 5重量%	10.5	9.1
サッカロース 10重量%	10.6	10.4
サッカロース 5重量%	10.6	10.3

この結果、凍結乾燥後長期間経過時におけるHbA<sub>1c</sub>を安定に保つためには、安定剤としてサッカロースを添加することが最適であることが明らかになった。

【0066】

【発明の効果】本発明により、長期間安定で、かつ新鮮血液のHPLCクロマトグラムパターンを示す糖尿病診断等において極めて有用なHbA<sub>1c</sub>組成物が提供される。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.<sup>6</sup>

A61K 9/19  
47/26

識別記号

庁内整理番号

F I

A61K 9/14

技術表示箇所

B  
E  
L

(72)発明者 田口 路比呂

埼玉県川越市の場1361番地1 株式会社ビ  
ー・エム・エル総合研究所内